

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-027020

(43)Date of publication of application : 30.01.1996

(51)Int.Cl. A61K 38/00
A61K 38/22
// C07K 14/51

(21)Application number : 06-166917

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM CORP

(22)Date of filing : 19.07.1994

(72)Inventor : SUZUKI FUJIO
KAI YUJI
KONDO ATSUSHI
UESONO AKITO

(54) OSTEOCLAST FORMATION AND BONE RESORPTION PROMOTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an osteoclast formation and bone resorption promoter effective in treating metabolic osteopathy for which there has not been any effective therapy up to the present.

CONSTITUTION: This osteoclast formation and bone resorption promoter contain a cartilage growth factor having the following physico-chemical properties as an active ingredient: (1) about 16000 Da molecular weight measured by a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis; (2) having activities in proliferating a cartilage alone or in the coexistence of a fibroblast growth factor and (3) having activities in promoting the differentiating functions of the cartilage. The cartilage growth factor preferably has an N-terminal amino acid sequence represented by formula I and a partial amino acid sequence represented by formulas II to IV. A substance having inhibiting actions on the bone resorption of the medicine is regarded as capable of suppressing the formation of an osteoclast and having effects on suppression of the bone resorption. Thereby, a suitable evaluation system is used to screen a substance capable of inhibiting biological activities of the cartilage growth factor. As a result, the medicine for osteopathy such as osteoporosis is simply obtained.

Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Cys
Ser Ser Asp Glu Ile Arg Thr Cys Asl Gly
Ile Gly Cys Gly Glu Tyr Thr Ala Glu Arg
Asn Glu Cys Leu Glu Glu Gly Val Asp Val
Leu

I

Asn Ala Ile Asn Asp Gly Val Arg Ile

II

Leu His Glu Gly Val Asp Val Leu Cys Ser
Asp Gly Ser Thr Val Tyr Ala Pro Phe

III

Val Tyr Trp Gly Ile Glu Ser His Ile His
Tle Glu Asp Cys Asn Leu Ser Asp

IV

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-27020

(43) 公開日 平成8年(1996)1月30日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	A B J			
38/22	A D S			
// C 0 7 K 14/51	Z N A	8318-4H		
			A 6 1 K 37/ 02	A B J
			37/ 24	A D S
			審査請求 未請求 請求項の数5	OL (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-166917

(22) 出願日 平成6年(1994)7月19日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 鈴木 不二男

大阪府豊中市中桜塚2-13-11

(72) 発明者 関 祐司

大阪府河内長野市千代田南町23-23

(72) 発明者 近藤 淳

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72) 発明者 上園 昭人

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 暁司

(54) 【発明の名称】 破骨細胞形成促進及び骨吸収剤

(57) 【要約】

【構成】 下記の理化学的性質を有する軟骨細胞増殖因子を有効成分とする破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

① SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16,000ドルトンである。

② 軟骨細胞を単独でまたは繊維芽細胞増殖因子共存下で増殖させる活性を有する。

③ 軟骨細胞の分化機能を促進させる活性を有する。

【効果】 本発明によれば、現在まで有効な治療法なかった代謝性骨疾患に対して有効な治療法を、さらには骨疾患に対する治療薬の新しいスクリーニング法を提供することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する軟骨細胞増殖因子を有効成分とする破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

① SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16,000ドルトンである。

② 軟骨細胞を単独でまたは繊維芽細胞増殖因子共存下で増殖させる活性を有する。

③ 軟骨細胞の分化機能を促進させる活性を有する。

【請求項2】 請求項1記載の軟骨細胞増殖因子が配列表の配列番号：1で表わされるN末端アミノ酸配列及び配列表の配列番号：2、3及び4で表わされる部分アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1記載の破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

【請求項3】 請求項1記載の軟骨細胞増殖因子が配列表の配列番号：1で表わされるN末端アミノ酸配列及び配列表の配列番号：2から14で表わされる部分アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1記載の破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

【請求項4】 請求項1記載の軟骨細胞増殖因子が配列表の配列番号：15に記載のアミノ酸配列で表わされることを特徴とする請求項1記載の破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

【請求項5】 請求項1記載の軟骨細胞増殖因子がヒトまたは動物組織由来である請求項1記載の破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、軟骨細胞増殖因子を有効成分とする破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 破骨細胞は、造血幹細胞由来の単核細胞に由来し、血行を介して骨表面に運ばれた細胞が分化して形成される細胞である。一方、骨芽細胞は間葉由来の未分化細胞や線維芽細胞、間質細胞などの基質形成細胞系に属する前駆細胞から分化し、骨基質を形成する。このように、破骨細胞は骨芽細胞とは系列の異なる前駆細胞に由来する。その特徴としては、終末分化して多核となった増殖能の乏しい巨細胞であり、多数のカルシトニン受容体ならびに酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性を発現することが挙げられる。また、破骨細胞は骨や象牙質などの石灰化組織を吸収することが出来る。

【0003】 破骨細胞の形成に関しては、その前駆細胞である造血幹細胞由来の単核細胞をマクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF)や顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)が増殖させ、さらに、骨芽細胞様の間質細胞との細胞接触により破骨細胞へと分化すると考えられている。破骨細胞の活性化には、1a,25

(OH)、ビタミンD₃や副甲状腺ホルモン(PTH)、副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)、各種プロスタグランジンおよびインターロイキン-1の様な骨吸収促進因子の添加が効果的である。しかしながら、骨芽細胞およびその類縁細胞の培養上清や高カルシウム血症を惹起する腫瘍細胞の培養上清等から破骨細胞分化因子あるいは破骨細胞活性化因子の様な内因性の蛋白及びペプチド性因子は未だ同定されていない。

【0004】 破骨細胞は骨のモデリング等、骨代謝に於て重要な機能を有する細胞であり、骨粗鬆症等の代謝性骨疾患に直接関与すると考えられている。しかし、その細胞起源、形成機序等に関しては未だ不明な点が多く、骨代謝及び疾患への重要な関与は予想されているが、その機構解明には至っていない。破骨細胞の分化あるいは活性化に関与する因子の一つを同定したことは、その形成機序及び骨代謝への関与を明らかにする指針を得ることにつながり、代謝性骨疾患治療の確立を可能にすると考えられていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、破骨細胞形成促進能または破骨細胞活性化能を有する因子を得るべく鋭意検討を重ねた結果、意外にも、先に本発明者ら軟骨細胞増殖因子として同定した特開平5-255398号公報に記載の分子量が約16KDaのタンパク質(以下、「コンドロモジュリン-ⅠⅠ」と称することもある)が、破骨細胞形成促進活性及び骨吸収促進活性を有することを見出し本発明を完成するに至った。

【0006】 即ち、本発明の要旨は、下記の理化学的性質を有する軟骨細胞増殖因子を有効成分とする破骨細胞形成促進及び骨吸収促進剤に存する。

① SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16,000ドルトンである。

② 軟骨細胞を単独でまたは繊維芽細胞増殖因子共存下で増殖させる活性を有する。

【0007】 ③ 軟骨細胞の分化機能を促進させる活性を有する。

以下、本発明をさらに詳細に説明するに、本発明の軟骨細胞の増殖及び分化機能の誘導を促す作用を有する新規なタンパク質は、特開平5-255398号公報に記載のように、例えば、牛胎児軟骨を破碎し、これを遠心分離した上清を限外濾過膜により分画、濃縮したものを、Sephacryl S200カラム(ファルマシア社製)等による分子ふるいクロマトグラフィーによりさらに分画したのち、ヘパリン-Toyopearlアフィニティーカラム(トーソー社製)に吸着させ、例えば0.5MNaClを含む緩衝液で溶出し、次いで、YMCpack C8カラムクロマトグラフィー(ワイエムシー社製)等により溶出条件を変えて繰り返し精製することによって得られる。精製された蛋白質はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16,

000ドルトンであり、軟骨細胞を単独または繊維芽細胞増殖因子共存下で増殖させる活性及び軟骨細胞の分化機能を促進する活性を有する。

【0008】またコンドロモジュリン-IIは、配列表の配列番号：1に示すようなN末端アミノ酸配列及び配列表の配列番号：2、3及び4に示すような部分アミノ酸配列を含む。より好ましくは、さらに部分アミノ酸配列として配列表の配列番号：5から14に記載のアミノ酸配列を含むものが挙げられる。なお、軟骨細胞の増殖活性及び分化機能の促進活性を損なわない範囲でかかるアミノ酸の一部を除去、置換、修飾または追加するなどの改変を行ったものも本発明のコンドロモジュリン-I Iに含まれる。

【0009】本発明で使用するコンドロモジュリン-I Iは、生物学的にコンドロモジュリン-I Iと同等の活性を有するものであれば、いかなるものも使用することができる。ヒト患者の治療を考慮した場合、ヒト由来のものであることが望ましいが、そのアミノ酸配列中に他の動物組織由来のコンドロモジュリン-I Iの配列を含むものであってもよい。即ち、活性の上昇、安定性の

上昇を目的として、N末端から数個のアミノ酸を欠失させたものや、逆にN末端にいくつかのアミノ酸を付加することも可能である。

【0010】本発明において、コンドロモジュリン-I Iの破骨細胞形成促進活性及び骨吸収促進活性は、例えば次のようにして測定される。ウサギ大腿骨から分離した5%ウシ胎仔血清を含む骨細胞を、滅菌処理した象牙質上に添加しその骨吸収活性を見るアッセイ系に、ウシ胎仔軟骨から精製したコンドロモジュリン-I Iを0.1- 100 ng/mlの濃度で添加し、その骨吸収促進活性を検討した。その結果、0.1ng/ml ChM-II濃度で活性が検出され、3-5 ng/mlで最大活性を示した。

【0011】本発明の破骨細胞形成促進及び骨吸収剤は、例えば骨形成が盛んであり、その成長を抑える必要があるような疾患の場合には、コンドロモジュリン-I Iをそのまま、あるいは常法により製剤化、医薬組成物化して投与することができる。具体的には、コンドロモジュリン-I I 1 ngから100 µgを軟骨疾患部位にコラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、骨セメント、

【0012】また本発明の破骨細胞形成促進および骨吸収剤は、新たな骨疾患治療剤を探索する上においても有用である。すなわち同薬剤に対して阻害作用を有する物質は、破骨細胞の形成を抑制し、骨吸収を抑制する効果があると考えられる。従って適当な評価系を用いてコンドロモジュリン-I Iの生物活性を阻害する物質をスク

リーニングすることにより、骨粗鬆症等の骨疾患に対する薬剤が簡便に得られる。

【0013】

【発明の効果】本発明により、コンドロモジュリン-I Iが破骨細胞に対してその分化あるいは骨吸収活性を促進することが判明した。本発明によれば、現在まで有効な治療法がなかった代謝性骨疾患に対して有効な治療法を、さらには骨疾患に対する治療薬の新しいスクリーニング法を提供することができる。

【0014】

【実施例】以下の実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は、その要旨を越えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例1

150mm厚の象牙質スライスを直径6mmの円盤状に切断し、70%アルコール中で超音波処理することにより滅菌した。a-MEMで洗浄した後、各スライスを96ウェルプレートのウェル中に移し、5%ウシ胎仔血清 (FBS) と別に調製したウサギ骨細胞 1.25×10^4 個を含むa-MEM 250mlをその上に添加し、CO₂ インキュベーター中 (5%CO₂, 95%空気) 37°Cで2時間インキュベートした。2時間後、5%FBSと各濃度のコンドロモジュリン-I Iを含むa-MEM 100 mlを加えCO₂ インキュベーター中 (10%CO₂, 90%空気) 37°Cで15時間インキュベートした後、象牙質スライスからハンディーエンジンにより骨細胞を取り除き、酸性ヘマトキシリンにて3分間染色し、顕微鏡下、ピット当たりのメッシュの数を勘定し破骨細胞の骨吸収活性とする。

【0015】図1に、本アッセイ系を用いてコンドロモジュリン-I Iの骨吸収活性の検定を行った結果を示す。図中、横軸はコンドロモジュリン-I Iの濃度を、縦軸は象牙質スライス当たりのメッシュの数を示し、○はコンドロモジュリン-I Iの結果を、△はビタミンD3 (ポジティブコントロール) の結果を表す。コンドロモジュリン-I I 0.1ng/mlから活性が検出され、濃度依存的に活性の促進が観察され、3ng/mlで最大活性を示した。この結果より、コンドロモジュリン-I Iが低エネルギーで破骨細胞の分化促進、あるいは活性化促進作用を有することは明らかである。

【0016】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：41

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

5

6

配列

Gly	Pro	Trp	Ala	Ile	Ile	Cys	Ala	Gly	Lys	10
Ser	Ser	Asn	Glu	Ile	Arg	Thr	Cys	Asp	Gly	20
His	Gly	Cys	Gly	Gln	Tyr	Thr	Ala	Gln	Arg	30
Asn	Gln	Lys	Leu	His	Gln	Gly	Val	Asp	Val	40
Leu										41

【0017】配列番号：2

*フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：9

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

10 組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

*

配列

Asn	Ala	Ile	Asn	Asn	Gly	Val	Arg	Ile	9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

【0018】配列番号：3

※フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：19

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

※

配列

Leu	His	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Leu	Cys	Ser	10
Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Phe		19

【0019】配列番号：4

★フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：18

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

★

配列

Val	Tyr	Pro	Gly	Ile	Gln	Ser	His	Ile	His	10
Ile	Glu	Asn	Cys	Asp	Leu	Ser	Asp			18

【0020】配列番号：5

30★フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：6

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

☆

配列

Ile	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	6
-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

【0021】配列番号：6

◆フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：5

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

40 組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

◆

配列

Met	Phe	Tyr	Ile	Lys	5
-----	-----	-----	-----	-----	---

【0022】配列番号：7

*フラグメント型：中間部フラグメント

配列の長さ：9

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

組織の種類：胎児軟骨

配列の種類：タンパク質

*

配列

Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln	Lys	9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

7

【0023】配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Asn	Cys	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Thr	Val	Tyr	10
Leu										11

【0024】配列番号：9

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Phe	Tyr	Ile	Lys	Pro	Ile	Lys	Tyr	Lys	Gly	10
Ser	Ile	Lys	Lys							14

【0025】配列番号：10

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Lys	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln	Lys	10
Val	Tyr	Pro	Gly							14

【0026】配列番号：11

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Lys	Pro	Tyr	Lys	Asn	Lys	Asn	Ala	Ile	Asn	10
Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Ser	Gly	Gly			18

【0027】配列番号：12

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Lys	Ile	Met	Gly	Gln	10
Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Asn	Lys	Asn	Ala		19

【0028】配列番号：13

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Phe	Cys	Ile	Lys	Met	10
Phe										11

【0029】配列番号：14

配列の長さ：27

*フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

*

*フラグメント型：中間部フラグメント

10 起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

※

★フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：ウシ

20 組織の種類：胎児軟骨

★

☆フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

☆

◆フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

◆

*フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：ウシ

組織の種類：胎児軟骨

*

配列の型：アミノ酸

50 トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

* 生物名：ウシ

フラグメント型：中間部フラグメント

組織の種類：胎児軟骨

起源

*

配列

Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu	10
Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln	Lys	Val	Tyr	20
Pro	Gly	Ile	Gln	Ser	His	Ile				27

【0030】配列番号：15

※ 配列の種類：タンパク質

配列の長さ：133

起源

配列の型：アミノ酸

10 生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

※ 組織の種類：胎児軟骨

配列

Gly	Pro	Trp	Ala	Ile	Ile	Cys	Ala	Gly	Lys	10
Ser	Ser	Asn	Glu	Ile	Arg	Thr	Cys	Asp	Gly	20
His	Gly	Cys	Gly	Gln	Tyr	Thr	Ala	Gln	Arg	30
Asn	Gln	Lys	Leu	His	Gln	Gly	Val	Asp	Val	40
Leu	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Tyr	Ala	50
Pro	Phe	Thr	Gly	Lys	Ile	Met	Gly	Gln	Glu	60
Lys	Pro	Tyr	Lys	Asn	Lys	Asn	Ala	Ile	Asn	70
Asn	Gly	Val	Arg	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Phe	80
Cys	Ile	Lys	Met	Phe	Tyr	Ile	Lys	Pro	Ile	90
Lys	Tyr	Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Lys	Gly	Glu	100
Lys	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln	Lys	110
Val	Tyr	Pro	Gly	Ile	Gln	Ser	His	Ile	His	120
Ile	Glu	Asn	Cys	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Thr	130
Val	Tyr	Leu								133

【図面の簡単な説明】

★活性の検定を行った結果を表す図面である。

【図1】実施例1のコンドロモジュリン-11の骨吸収★

【図1】

